

札幌医誌 7 (2/3), 115~119 (1955)

Actomyosin 溶液の粘度に関する研究

(I) KCl 濃度の影響

鳥 元 健 三

札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

札幌医科大学皮膚泌尿器科学教室 (主任 外塚教授)

Studies on the Viscosity Change of Actomyosin-Solution

(I) Influence of Various KCl Concentration

By

KENZO TORIMOTO

Department of Physiology (Chief: Prof. T. NAGAI)

Department of Dermatology & Urology (Chief: Prof. I. TOZUKA)

Sapporo University of Medicine

筋生理学において、contractile element たる actomyosin (AM) に関する研究が近年とみに発展し、殊に A. Szent-Györgyi¹⁾ により一応の体系が築かれている。しかしながら氏の学説の根底をなす基本的諸成績についてはその後の追試検討を経ないものが多く、これ等に基づいてさらに発展を期待する場合、一応精細なる再検討を要することは当然と考えられる。最近 Spicer²⁾ 等により、超沈澱に関して clear phase, gelation の研究が進められ、その機構の解明は AM 系の結合解離の機構追求の大なる手がかりとなると考えられる。

著者は AM 系の結合解離の機構解明への第一歩として、AM 系の最も基本的性質の一つである粘度変化につき、2, 3 の観察を試みた。本論文においては塩濃度による AM 液粘度の変化について報告する。

実験方法

実験材料: 家兎骨髄筋を使用、AM は A. Szent-Györgyi³⁾ に従って作成したものを数回洗滌精製した。精製 myosin は A. Szent-Györgyi³⁾, actin は Straub⁴⁾ の方法による。ATP は A. Szent-Györgyi の方法で精製し

た Ba-salt で、使用に当り K-salt としたものである。純度は 65% ないし 72% のものを使用した。これ等を材料として、各 KCl 濃度下の洗滌 myosin-B (M-B), 及び合成 AM の粘度及び ATP 添加後の粘度を測定した。

実験方法:

1) 各 KCl 濃度における M-B の粘度

a) 測定液温: 25°C

b) KCl 濃度: 終末濃度 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 M となる如く KCl 液を加えた。

c) M-B 濃度は各 KCl 濃度において一定とし、特に蛋白濃度は測定しなかつた。

d) ATP 液: 1% 液 (2×10^{-2} M) 0.4 cc 添加、上記各 KCl 型濃度について、M-B の粘度変化を全量 5 cc について Ostwald 型粘度計にて観察、これを各 KCl 濃度において plot し、また ATP による粘度降下の最低値を各 KCl 環境下で plot した。

2) 合成 AM についての粘度

a) actin 及び myosin 液: 各 7.5 mg/cc のものを 2 cc ずつ単独または等量混合して用いる。

b) KCl 濃度: 0.4, 0.6, 1.0, 2.0 M の 4 段階につき測定した。

c) ATP: 1% 液 0.2 cc

1) と全く同様に全量 6 cc につき粘度測定す。これは各液作成上便なるため 6 cc としたのであつてその他の意味は

1) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction (1953, 1951).

2) Spicer et al.: J. Biol. Chem. 199, 289 (1952).

3) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction (1947).

4) Straub, F.B.: cit 3).

ない。

実験成績

I. Fig. 1 に示したのは、各 KCl 濃度における ATP 添加による粘度変化であり、Fig. 2 は initial viscosity と ATP 添加後の粘度最低値との関係を示した。提示した如く、2.0 ~ 0.4 M KCl の各段階においてこれ等溶液は ATP 添加後 AM 系特有の 3 つの段階^{5), 6)}、即ち viscosity response,

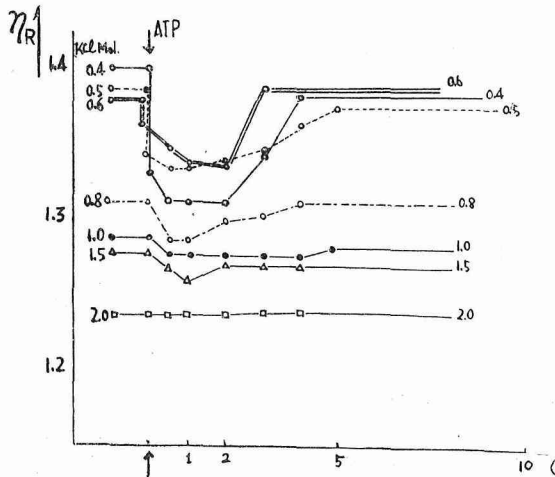


Fig. 1. Viscosity change after addition of ATP in various KCl concentrations in purified actomyosin-solution.

Abscissa: Time after addition of ATP

Ordinate: Relative viscosity

ATP addition indicated by arrow

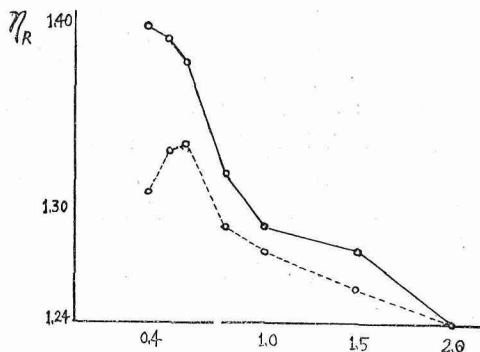


Fig. 2. Relationship between initial viscosity and ATP-drop in purified actomyosin-solution in various KCl concentrations.

Abscissa: KCl concentration

Ordinate: Relative viscosity

○—○ without ATP

○—○ ATP added

splitting time, recovery effect を形成しているが、この場合、KCl 濃度稀薄となるにつれて、initial viscosity は上昇しており、これに伴って ATP 添加後の粘度も上昇して行く。0.4 M KCl において initial viscosity は最高値を示し、それ以下の濃度では等電沈澱或は超沈澱が起り粘度は不定の値をとり、Spicer²⁾ のいう如き clear phase 或は gelation の発現を観察しなかつた。従つて著者の実験においては、これ等低塩濃度下においては粘度測定の対象たり得ない。

II. Fig. 3 の如く myosin の粘度は 0.6 M が最高であり、actin の粘度は 0.4 M KCl において最高である。myosin に ATP を添加すると僅少であるが各濃度において下降を見、actin においては殆ど変化は見られない。

合成 AM においても、ATP 添加せざる場合、0.4 M まで KCl 濃度減少とともに粘度は上昇する。ATP 存在下では 2 M においても相当の粘度降下があり、それより KCl 濃度減少するもほぼ同程度まで drop を認め、0.4 M においてはじめて僅少の上昇を見るだけである。これ等の点を plot するならば、終始ほぼ水平線を描く。また Fig. 4 の如く splitting time は KCl 濃度増加とともに延長の傾向を示し、0.4 M KCl では 10 分、0.6 M で 14 分であり、1.0 ~ 2.0 M では 25 分経過後もなお回復を見ない。

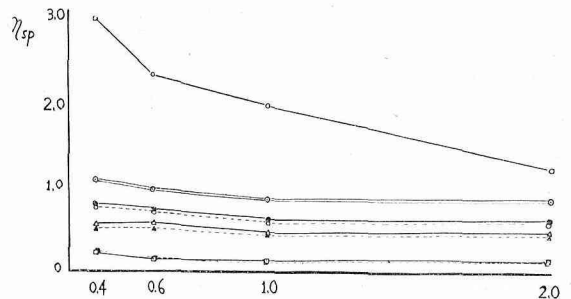


Fig. 3. Relationship between initial viscosity and ATP-drop and theoretical value in synthetic actomyosin in various KCl-concentrations.

Abscissa: KCl concentration (M)

Ordinate: Specific viscosity

○—○ actomyosin (myosin 15 mg+actin 15 mg+KCl)

○—○ actomyosin+ATP (1% 0.2 cc)

●—● calculated curve (myosin+actin)

○—○ calculated curve (myosin+ATP) + (actin+ATP)

△—△ myosin 15 mg+KCl

▲—▲ myosin 15 mg+KCl+ATP

□—□ actin 15 mg+KCl

■—■ actin 15 mg+KCl+ATP

5) Mommaerts, W.F.H.M.: J. Gen. Physiol. 31, 36 (1948).

6) Csapó, A.: Acta Physiol. Scand. 19, 100 (1948).

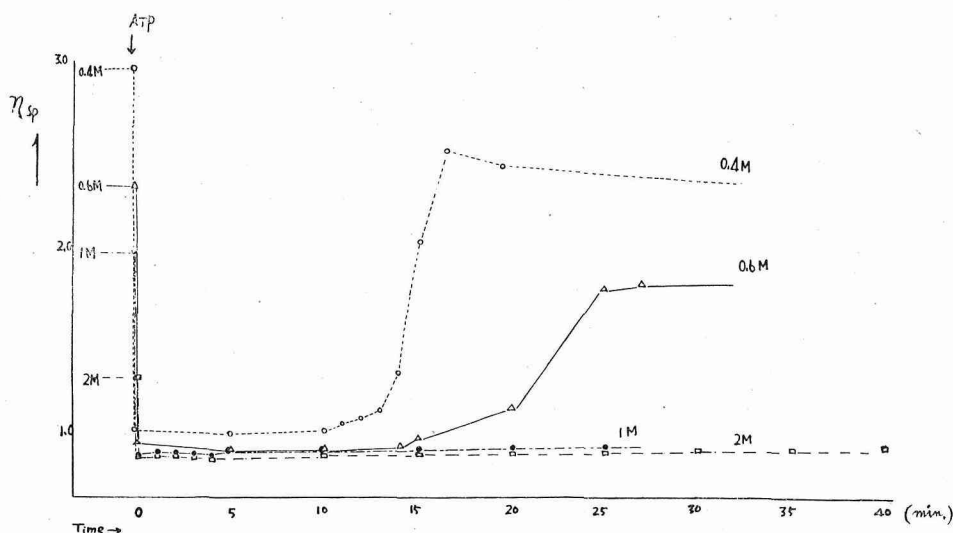


Fig. 4. Viscosity change after addition of ATP in various KCl concentrations in synthetic actomyosin.

Abscissa: Time after addition of ATP

Ordinate: Specific viscosity

ATP addition indicated by arrow.

AM 液における ATP 添加後の粘度降下は AM の解離に因るとされるから、これまでの実験成績を総括するために myosin 単独及び actin 単独の場合の ATP 添加後の粘度の加算の計算値と比較して見た。これによると曲線の性質がほぼ一致しているが数値における多少のずれが見られる。計算値の曲線は実測曲線にほぼ平行して、比粘度で約 0.25 低位に存在する。

総括並びに考按

AM 系粘度の KCl 濃度による変化に関しては、先に A. Szent-Györgyi²⁰⁾ が報告したところであり、彼によれば、KCl 2 M より 0.4 M までを粘度域 (dissolution), 0.4 M よりなお稀薄となれば等電沈澱域 (isoelectric precipitation) 超沈澱域 (superprecipitation) としている。この

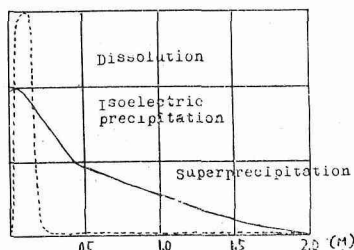


Fig. 5. The state of actomyosin-solution in various KCl concentrations.
(cit. Szent-Györgyi²⁰⁾)

schema は Fig. 5 に掲げる如きものである。しかし氏によれば、初期粘度が KCl 濃度下降にともなつて漸次上昇するに反して、ATP 添加後の粘度曲線は常に水平線を形成し、両線は 2 M において一致している。これは AM が 2 M KCl において完全解離し、各 KCl 濃度において ATP 添加により完全な解離が行われることを意味するものと解釈された。つまり ATP 存在下では KCl 濃度の減少とともに粘度下降度、いわゆる “activity” の増加を見、結局水平線を画くのである。今回試みた第 1 の実験は、M-B を用いて行つたこの schema に対する追試であるが、第 1 に 0.4 M 附近を境として等電沈澱域に入り、0.2 M 以下において超沈澱域に入るということは A. Szent-Györgyi²⁰⁾ の成績と一致し、この等電沈澱域、超沈澱域における粘度測定は前述の如く粘度測定の対象とはならない。第 2 に、抽出法は A. Szent-Györgyi²⁰⁾ の方法に準じたにかかわらず、各段階において AM の完全解離が見られず、KCl 濃度減少につれて AM 粘度の上昇とともに (これは氏の成績に一致する)、ATP による下降粘度曲線の上昇が見られる。

この成績を考按するに、先ず 2 M において完全解離状態を示すにかかわらず、2 M 以下の各 KCl 濃度下で AM が ATP 添加後にも 2 M の線まで下降しないということは、解離に対する阻止条件が存在し、しかもこれが、この AM の抽出法に依存するのではないかということを示唆する。従つて抽出法に難ありしか否かは反省しなければならない

い。大量の M-B を得るには時間的な制限が介在するとともに、各 KCl 濃度の sample を得るためには蛋白濃度が必然的に低くなるという条件が加わることは止むを得ない。しかしその他に関しては充分な注意のもとに抽出洗滌操作し、遅くとも 48 時間にて洗滌精製を完了するように心掛け各濃度の粘度測定は 8 時間以内に完了するようにし、条件を一致せしめることにも努めた。変性に対する諸条件は出来得る限り排除した。ここに頻回の水洗という条件が上記実験成績の原因となることが考えられる。即ち冷蒸溜水により繰返される水洗が、AM 系における hysteresis¹⁾ の発現を促進して、actin と myosin の結合力を強固なものとするために、かかる曲線が生れたのではないかということである。これに関する実験は残された課題の 1 つである。また ATP の量的関係も考慮の余地がある。

Kováth⁷⁾, Csapó⁸⁾ 等は囊に心筋、子宮筋について粘度測定的に、初期粘度及び ATP 降下の値、即ち activity を規準として、AM 定量を行つているが、上述の如き何等かの原因による完全解離の阻止が介入する場合には A. Szent-Györgyi⁹⁾ がいうような単純な曲線 (Fig. 5) を常に得ることは疑問視され、従つてかかる方法による AM 定量には多くの疑点が残される。事実、このことに関しては別個の面から H. H. Weber¹⁰⁾ 等により批判されている。

0.4 M KCl 以下の粘度測定は先述の如く著者の方法では至難であり、clear phase はこの実験では認められない。このことは Spicer¹¹⁾ のいう如く pH range の相違等に基づくものと考えられ、これ等に関しては実験方法の改善等と相俟つて今後の研究に待ちたい。

さて合成 AM を対象とした第 2 の実験において、先ず注目される点は、ATP 添加後粘度はさきの M-B の場合に反し水平線を画くということである。A. Szent-Györgyi⁹⁾ による (Fig. 5) に示す如き ATP 添加後の水平な粘度曲線は、KCl 濃度の各段階における完全なる解離状態を示しているもので、合成 AM では M-B に反してこの実験に極めて近いことが認められる。ただし 2 M KCl においても ATP 添加後なお若干の粘度降下を見、また理論値と実測値の間にも同様若干の差を見る点はいささか A. Szent-Györgyi⁹⁾ の成績と異なる。しかしこれ等は実験条件の差、ことに本実験において蛋白濃度が 5 mg/cc であり、構造粘性がかなり高いと考えられる点等を考慮すべきであろう。また A. Szent-Györgyi⁹⁾ の成績においても、これ等の点に関して

は必ずしも厳密ではない。

以上より合成 AM における成績は先の M-B における成績とことなり、A. Szent-Györgyi⁹⁾ の成績に極めて近い。合成 AM 及び M-B におけるこの差の、よつて来るところについて考察するに、合成 AM は actin 及び myosin の混合による合成後何等の操作も加えられず、また合成後実験に至るまでの時間も短い等の関係から先述の hysteresis に関してこれを促進する要因が少なく、従つて M-B に比して hysteresis の少ないことが大いに関係するものと考えられる。

さて最後に、全般的に第 1 と第 2 の実験 (Fig. 1, 4) を比較して見るに、合成 AM における splitting time は M-B のそれに比し著しく延長している。この splitting time は蛋白濃度、添加 ATP 量の多少にも影響されるのは勿論であり、また actin, myosin の再結合の機構が条件の差により単純には律し得ないとも考えられ、なお今後の検討に待たねばならないところであるが、これらの諸点を考慮に入れてもなおこの場合 splitting time の延長は著明と考えられる。このことは換言すれば、myosin-ATPase activity の低下を意味するものと解せられる。さて、実験方法で述べた如く、この実験においては A:M=1:1 であり、これは Spicer 等¹¹⁾ のいうような stoichiometric ratio ではなく、比率的に actin 量の大なる点が注目される。この条件を当教室の湯田坂¹²⁾ の成績即ち actin が高塩濃度側において myosin-ATPase を抑制するという成績と併せ考えると、actin の ATPase 抑制によつてかかる splitting time の延長が生じたと解せられ、誠に興味深いことである。これ等の詳細に関しては目下検討中である。

なお、本実験と比較対照すべきものに、大原¹³⁾ 及び永井^{14), 15)} の AM 粘度に対する温度の影響がある。氏等は AM 粘度は温度上昇とともに著明に減少し漸次 myosin の粘度に近づくとともに、AM の ATP による activity も温度上昇とともに減少することを見出し、これより AM 粘度に対する温度効果と塩効果の間の平行性を示唆した。Fig. 3 及び Fig. 4 の成績に見る如く、AM 粘度は KCl 濃度の増加とともに減少している点は確かに以上の考察を裏付ける。しかしながら永井等の成績において、splitting time は温度上昇とともに短縮するが、本実験において KCl 濃度増加とともに逆にこれが延長する事実は注目を要する。永井等は myosin-B を用いたに反し、本成績は合成 AM であ

7) Kováts, J.: Nature 163, 606 (1949).

8) Csapó, A.: Nature 162, 218 (1948).

9) Weber, H. H.: Advances in Protein Chemistry 7, 161 (1952).

10) Spicer, S. S. et al.: J. Biol. Chem. 201, 639 (1953).

11) Spicer & Gergely: J. Biol. Chem. 188, 178 (1951).

12) 湯田坂: 札幌医誌 5, 90 (1951).

13) 大原: 札幌医誌 4, 421 (1953).

14) 永井・他: 札幌医誌 5, 239 (1954).

15) 永井・他: 札幌医誌 5, 375 (1954).

る点において問題は残るが、splitting time に関する以上の差異は、温度効果の本質的機構を単純に KCl 効果の促進と見做し難いことを示唆する。但しこの際さらに、splitting time は ATPase 活性に関係し、粘度減少即ち AM の解離とは異なる過程である点も考慮されねばならぬかも知れない。しかしながらたとえ機構そのものに差があるとしても、AM の粘度減少即ち AM 解離に対する塩と温度の効果は結果において同様であることは間違いない。

以上要するに本実験における成績より見るとき、AM 粘度の KCl 濃度に依存する事実は認められ、この点 AM の結合解離に electrostatic force が関与するとの A. Szent-Györgyi の考えは一応首肯し得ると考えられる。しかしながら M-B と合成 AM の間の差において認められる如く、AM の結合解離にはなお幾多の条件が関与することが示唆される。これ等の点についてはさらに詳細なる検討にまたねばならない。

結 語

actomyosin 液の粘度を各種 KCl 濃度下について測定し、次の如き結果を得た。

- 1) 洗滌 AM における粘度域は 2 M~0.4 M KCl である。
- 2) 洗滌 AM 液において、2 M KCl では actin,

myosin の解離は充分行われるが、KCl 濃度が低くなるにつれて ATP による降下粘度値は高い値を示し、この解離が不充分と考えられる結果を得た。

3) actin: myosin=1:1 の合成 AM における KCl 濃度変化に伴う粘度変化は、ほぼ A. Szent-Györgyi の提示せるものに一致した成績を得た。

4) 合成 AM に ATP を添加すれば、各 KCl 濃度においてほぼ一定の高さまで粘度下降し、上記洗滌 AM の如き低 KCl 濃度における解離抑制の傾向は見られなかつた。

5) 合成 AM の ATP による下降粘度値と、その合成要素たる actin, myosin の粘度総和とがほぼ平行線で同一の傾向を示す。

6) splitting time は合成 AM の場合、洗滌 AM におけるそれに比し著しく延長されている。

7) 以上、actin, myosin の解離の機構並びに洗滌及び、合成両 AM 系の性質の相違の機構について、また splitting time の延長即ち myosin-ATPase activity 低下の原因について考察を加えた。

(昭和 30. 1. 17 受付)

Summary

The viscosity change of actomyosin solution was studied under various KCl-concentrations and the following results were obtained.

The range of dissolution-stage of myosin-B (purified) is between 0.4 and 2 mol KCl. When the concentration of KCl is high (2 mol), the dissociation between actin and myosin is complete but it is incomplete under lower KCl concentration.

In experiments by synthetic actomyosin (the ratio of actin/myosin=1:1), the viscosity change depends on the concentration of KCl which coincides with the results as reported by A. Szent-Györgyi, however the inhibition of dissociation in lower KCl concentration as in the case of myosin-B was not to be observed.

On the other hand, it was clearly observed that the splitting time of ATP was longer in experiments of synthetic actomyosin than that of myosin-B.

From the results as mentioned above, the mechanism of the dissociation of AM-system and the meaning of the prolongation of splitting time are discussed.

(Received Jan. 17, 1955)